

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/02		7823-4B		
C 1 2 M 1/00	E	9050-4B		
1/04		9050-4B		
C 1 2 P 1/00	Z	9050-4B		
17/04		2104-4B		

審査請求 未請求 請求項の数18(全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-2230

(22) 出願日 平成3年(1991)1月11日

(31) 優先権主張番号 90 00279

(32) 優先日 1990年1月11日

(33) 優先権主張国 フランス (F R)

(71) 出願人 591006081

コミツサリア タ レネルジー アトミー
クフランス国パリ, リュ ドウ ラ フェデ
ラシオン, 31-33

(71) 出願人 591006092

ユ・エス・エス・イー・アンジェニリ・エト
ウド・エ・レアリザシオン・アグローアリ
マンテール・ウ, エール, アー,フランス国, 92220・パニユー, アベニ
ュー・アリスティド・ブリアン・116

(74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の培養物から抗酸化剤を生産し抽出する方法、並びに、該方法を実施するための光バイオリアクター

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 液体培地に懸濁させた光合成性微生物の培養物から抗酸化剤を生産しつつ抽出する方法、並びにこのような微生物を培養するための光バイオリアクターを提供する。

【構成】 密閉型光バイオリアクター2内で培地1に懸濁させた微藻類を培養し、光合成により微藻類が生成した酸素を回収して培地に再注入し、培地1から微藻類を分離し(6)、微藻類を溶解し(12)、微藻類の溶液を粉碎し(14)、粉碎した溶液に溶媒を加える(16)ことにより微藻類が生成した抗酸化剤を可溶化し、次いで、存在する液相を分離すること(18)からなる。

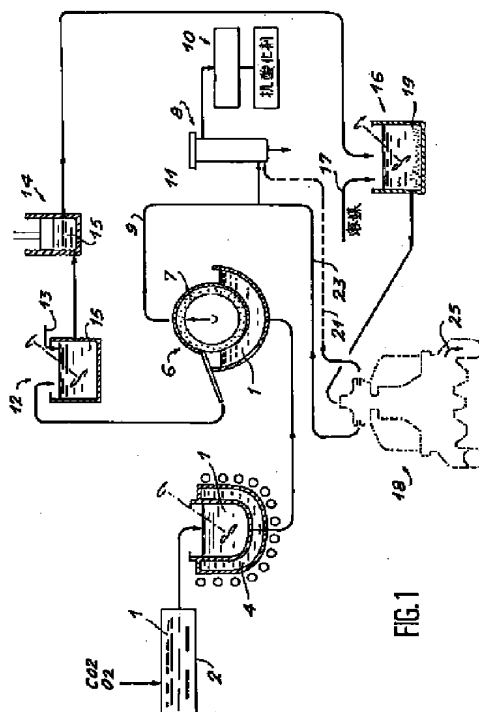


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗酸化剤を生産し、かつ、抽出する方法であって、以下の諸工程を包含してなる方法：

(a) 密閉型光バイオリアクター内で、液体培地に懸濁させた光合成性の微生物を培養する工程；この工程では、光合成により微生物が生成する酸素は回収され、かつ、培地に再注入され、前記微生物は微藻類とシアノバクテリアとからなるグループから選ばれる；

(b) 培地から微生物を分離する工程；

(c) 前記工程 (b) で分離された微生物を溶解する工程； 10

(d) 溶解された微生物を粉碎する工程；

(e) 前記工程 (d) で得た溶液に溶媒を加えて、微生物が生成した抗酸化剤を可溶化する工程；及び

(f) 存在する液相と固相とを分離する工程。

【請求項2】 前記工程 (b) を微生物が指数増殖期にあるときに実施することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 微生物の培養を自然照明条件下で実施し、かつ、前記工程 (b) を午後を実施することを特徴とする請求項1に記載の方法。 20

【請求項4】 抗酸化剤の生産を高めるための処理であって、培地の加熱若しくはイオン化からなる処理を培地に施す工程を包含してなる請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記溶媒は有機溶媒又は植物油若しくは鉱物油であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記工程 (d)、(e)、および (f) を約4℃で実施することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記工程 (f) で得た液相を濃縮し、次いで精製することを特徴とする請求項1に記載の方法。 30

【請求項8】 前記工程 (b) で分離した培地を濃縮し、次に精製することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記工程 (c) の溶液が20～100g／lの乾燥微生物を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項10】 光合成により生成された酸素を加圧下で培地に再注入することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記微生物はボルフィリジウム・クルエンタムおよびヘマトコッカス・プルビアリスから選ばれることを特徴とする請求項1に記載の方法。 40

【請求項12】 液体培地に懸濁させた光合成性微生物の培養物から抗酸化剤を生産するための密閉型光バイオリアクターであって、前記微生物は微藻類とシアノバクテリアとからなるグループから選ばれ、かつ以下の構成要素を包含してなる光バイオリアクター：

(A) 太陽光に対して透明で、その中を液体培地が循環するソーラー・レセプター；

(B) 前記ソーラー・レセプターの入口に接続され、光 50

合成に必要なCO₂を液体培地に供給する塔型のカーボネーター；

(C) 光合成により微生物が生成した酸素のコレクター；及び

(D) 回収された酸素をカーボネーターのところに再注入する手段。

【請求項13】 前記ソーラー・レセプターは、液体培地が循環する複数の平行なパイプからなり、端部のコレクターはこれらのパイプを連通することを特徴とする請求項12に記載の光バイオリアクター。

【請求項14】 前記カーボネーターの上部には液体培地の拡散プレートが設けてあることを特徴とする請求項12に記載の光バイオリアクター。

【請求項15】 前記カーボネーターは液体培地へのCO₂およびO₂の導入を容易にするためのライニングを備えていることを特徴とする請求項12に記載の光バイオリアクター。

【請求項16】 前記カーボネーターが、カーボネーターの底部からCO₂を供給するように塔内に配置された中央浸漬パイプと、カーボネーターの上部に液体培地を導入するための導管とを備え、もって、液体培地とCO₂含有ガスとがカーボネーター内で対向流方式に循環するようになっており、前記浸漬パイプの端部には孔隙率可変の焼結ガラス又は焼結ステンレスが設けてあることを特徴とする請求項12に記載の光バイオリアクター。

【請求項17】 前記光バイオリアクターが、さらに、CO₂供給導管を有するCO₂導入槽と、前記浸漬パイプを用いて前記槽からカーボネーターの底部へガスを導入する導管と、カーボネーターの頂部に配置されたガス排出導管であって排出ガスを前記槽内に再注入する導管と、前記槽内のガスを圧縮する手段と、前記浸漬パイプ内に導入されるガスの圧力を調整する手段、とを備えていることを特徴とする請求項16に記載の光バイオリアクター。

【請求項18】 培養物の培地に再注入される酸素富化ガスの圧力を制御する手段を備えていることを特徴とする請求項12に記載の光バイオリアクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、液体培地に懸濁させた光合成性微生物の培養物から抗酸化剤を生産しかつ抽出する方法、並びに、このような微生物を培養するための光バイオリアクターに関する。この方法は、集約的にかつ管理下に、工業的スケールで抗酸化剤を生産することを可能にするものである。

【0002】本発明はあらゆる抗酸化剤の生産に適用されるもので、特に、SODなる略称で知られるスーパーオキシドージスムターゼ酵素や、ビタミンCや、アルファター、ベーター、またはガンマターコフェロール（アルファターコフェロールはビタミンEである）の生産に適用される。

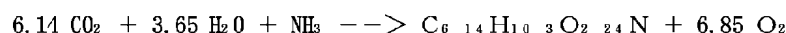
【0003】スーパーオキシドジスムターゼは互いに結合した2つのペプチド系サブユニットを有する金属酵素である。金属の性質に応じて分類される次の3種のSODが知られている：-Cu/Zn型SOD；真核生物(eucaryote)に良く見られる；この種のSODの伝統的供給源は牛の血液である；これらは赤血球から抽出される。



また、SODはスーパーオキシドラジカルを遊離する急性現象、或いは老化現象に使用される。SODは、特に、医薬の分野において抗炎症剤（リウマチ、関節炎）として使用され、化粧品分野において皮膚や髪を保護するため（例えば、紫外線防止）に使用され、農産物の分野（油や脂肪製品の保護、染色調整剤、又は飼料）、並びに、生医学の分野で使用される。

【0007】化粧品分野におけるSODの利用は特にFR-A-2,297,899に記載されている。

※



項 $\text{C}_{6.14}\text{H}_{10.3}\text{O}_{2.24}\text{N}$ は、バイオマスとも呼ばれる微生物に相当する。

【0010】1987年10月2日出願の本出願人のFR-A-2,621,323には、光合成性微生物を集約的にかつ管理下で生産する装置が記載されている。この装置は密閉型光バイオリアクターであり、このリアクターは、所望の1つの種の単独培養を制御すると共に、前記種の生成を容易にするために、培養パラメータ（例えば、温度、pH、培地中の CO_2 圧および O_2 圧）および栄養培地(nutrient medium)の組成を制御するように設計されている。

【0011】このような光バイオリアクターは、基本的に、微生物を含有する液体培地が循環する光透過性のソーラー・レセプター（又はソーラー・キャッチャー）と、ソーラー・レセプターの出口に接続され光合成に必要な CO_2 を液体培地に供給するカーボネーターと、微生物が産生した酸素および液体培地に溶解しない CO_2 を液体培地から除去するため光バイオリアクターに接続された脱ガス器とから構成されている。

【0012】カーボネーターは、 CO_2 に対する生物学的要求が常に満たされるに十分なだけ CO_2 をガス相から液相に確実に移す働きをする。従って、 CO_2 は微生物の生成を制限するファクターではない。

【0013】光や栄養培地やpH等のような他の培養条件が好都合なものであれば、 CO_2 に対する要求は大きくなり、その結果酸素の産生が多くなる。また、光バイオリアクターのソーラー・レセプター部においては、培地は溶解 O_2 で富化されると共に、 O_2 ガスのポケットが発生する。

【0014】FR-A-2,621,323には、光合成により発

*【0004】-Mn型SOD；ミトコンドリアの付近で真核生物に見られると共に、原核生物(procaryote)に見られる。

【0005】-Fe型SOD；原核生物、例えば好気性バクテリアに特異的であると思われる。

【0006】SODは次の反応に基くスーパーオキシドイオンの不均化の触媒である：

10※【0008】本発明は微藻類型又はシアノバクテリア型のあらゆる光合成性の微生物に適用されるものである。シアノバクテリアのうち最も良く知られているものは“ラン藻類(blue alga)”である。

【0009】光合成は、太陽エネルギーによる二酸化炭素から一次炭化水素物質への変換であり、酸素はこの生化学変換の主たる副産物である。この反応は次のメイヤーの式により表すことができる：

生した酸素を脱ガス器で除去することが教示しており、この酸素は光バイオリアクターの稼働の障害となると共に、特に、リアクターを良好に熱的に制御する上で障害となる（微生物の乾燥、光バイオリアクターの効率の悪化）と述べてある。さらに、酸素は或る種の微生物にとって有毒である。

【0015】上記フランス特許の教示に反し、本発明者は、光合成により発生した酸素を回収し、培地に再注入すれば、培養した微生物による抗酸化剤の産生が増加することを見出した。即ち、酸素濃度が高い条件においては、光合成性微生物はこのような酸化条件に対抗して反応し、抗酸化剤を合成する。

【0016】即ち、本発明は抗酸化剤を生産し抽出する方法を提供するもので、この方法は以下の諸工程からなる：

(a) 密閉型光バイオリアクター内で、液体培地に懸濁させた光合成性の微生物を培養する工程；この工程では、光合成により微生物が生成する酸素は回収され、培地に再注入される。前記微生物は微藻類(micro-alga)とシアノバクテリアとからなるグループから選ばれる。

【0017】(b) 培地から微生物を分離する工程。

【0018】(c) 工程(b)で分離された微生物を溶解する工程。

【0019】(d) 溶解された微生物を粉砕する工程。

【0020】(e) 工程(d)で得た溶液に溶媒を加えて、微生物が生成した抗酸化剤を可溶化する工程。及び、次いで

(f) 存在する液相と固相とを分離する工程。

【0021】好ましくは、培地への酸素の再注入は圧力

下で行う。

【0022】産生される抗酸化剤は異なるタイプのものであり、かつ、培養した種に依存している。

【0023】本発明が適用される微生物は、公知のあらゆる微藻類およびシアノバクテリアである。微藻類は、特に、ポルフィリジウム・クルエンタム(*Porphyridium cruentum*)のような紅藻類であり、これは酸化性の条件下で主として“Mn”型のSODを生産することを可能にする。

【0024】このSODは分子量が夫々20,000の2つのサブユニットからなり、それらは非共有結合により結合している。このものは平均4.2の等電点を呈する。

【0025】ポルフィリジウム・クルエンタム(*Porphyridium cruentum*)は、培養物1ml当たり平均10~20U(NBT-nitroblue tetrazolium-による分析に基づく)のSODを生成する(1mlの培養物は約1mgの微藻類の乾燥物(以下、MS)を含有する)。

【0026】ポルフィリジウム・クルエンタム(*Porphyridium cruentum*)は、さらに、ビタミンCの産生を可能にする。即ち、この微藻類は1kg当たり5~7グラムのビタミンCを含有する。

【0027】この微藻類については、“デルターアミノレブリン”系代謝経路が非常に発達している。この経路は特殊な顔料(フィコビリプロテイン)や上記SODをもたらす。

【0028】これに対し、ヘマトコッカス・プルビリス(*Haematococcus pluvialis*)のような緑藻類タイプの微藻類の培養物は、超酸化性の培地中で基本的にトコフェロールを生成し、特に、微藻類1kg当たり4~5グラムの濃度のアルファ・トコフェロール(ビタミンE)と0.5~1グラムの濃度のガンマ・トコフェロールを生成する。

【0029】この種の微藻類においては、“メパロン”系代謝経路が非常に発達している。

【0030】本発明に基く抗酸化剤の生産に好都合な条件は、酸素が高度に生成される条件、即ち、光合成活動が活発に行われる条件である。また、好ましくは、微生物の培養は自然照明条件下で行われ、培地からの抗酸化剤の抽出、従って、液体培地から微生物を分離する前記工程(b)は午後に行われる。

【0031】更に、抗酸化剤の生産にとって最も好都合な条件は、微生物が指数増殖期(exponential growth phase)にある条件(即ち、成長率が最大の条件)である。

【0032】不連続的に、即ち、“バッチ”方式で稼働させる場合には、指数増殖期は培養の初期に位置する。この時期には微生物は活発な分裂段階にある。これは光合成活動が最大になることを意味する。

【0033】連続的に培養する場合には、微生物を活発な分裂段階に維持するため、培地の更新を迅速にする必

要がある(1日当たり0.2~1回)。

【0034】微生物を培地から分離する前に、微生物の懸濁液に対して、細胞の膜透過性を増加させることにより培地の抗酸化剤濃度(特に、SOD濃度)を増加させるための処理を1回若しくは複数回施すことができる。

【0035】上記処理は、細胞の懸濁液を数分間にわたり40~50℃に加熱すること、又は、ガンマ線での懸濁液をイオン化することからなる。10kgrayの処理により、培地の抗酸化剤活性度を20%~100%富化することができる。

【0036】培地から微生物を分離する工程(b)はバイオマスを分離することを目的とするもので、細胞間抗酸化剤は工程(c)~(f)において培地(この培地は細胞外抗酸化剤を含有していることがある)から抽出される。

【0037】特にSODの場合には、酵素の半分以上は培地中にあり、この培地における活動度を測定すれば、場合によっては、培地を処理して培地から細胞外抗酸化剤を抽出するのが妥当であることがある。

【0038】微生物を溶解すること(工程(c))は、粉碎条件を改善するために微生物ジュースの濃度を調節することを可能にする。粉碎工程にとって最良の微生物濃度は、使用する種およびその生長段階に応じ、1リットル当たり乾燥物20~100gである。

【0039】粉碎工程は、微生物を破裂させ、すべての細胞内容物を溶媒に対してアクセス可能にすることを目的としている。この工程はホモジナイザー内で実施され、微生物は加圧と減圧とを反復して受ける。

【0040】工程(e)で使用する1種の溶媒又は複数の溶媒の混合物は、抽出すべき抗酸化剤に依存する。特に、SODおよびビタミンCは水溶性であるからその抽出は水溶液中で行われるのに対し、トコフェロールは脂溶性であるからその抽出はアセトン・タイプ若しくはメタノール・タイプの有機溶媒又は植物油若しくは鉱油油中で行われる。

【0041】同一種から生成された脂溶性の抗酸化剤と水溶性の抗酸化剤とを同時に抽出したい場合には、有機溶媒又は油を用いる。

【0042】相を分離する工程(f)は、水性溶媒を用いるか非水性溶媒を用いるかに応じて、混合物を2つ又は3つの相に分離することを目的としている。即ち、水溶性抗酸化剤を含有する水溶液と、脂溶性抗酸化剤を含有する油性溶液と、細胞残滓からなる固体相とである。この相分離工程は遠心分離により又は脈動カラム内でのデカンテーションにより実施される。

【0043】好ましくは、粉碎工程と溶媒添加工程と相分離工程(f)とは約4℃で実施される。

【0044】必要な場合には、工程(f)で得る油性相と水性相、および、微生物分離工程(b)で得る液体培地は、濃縮し、場合により精製することができる。

【0045】この濃縮は、限外濾過により、および／または、硫酸アンモニウムを用いた析出により実施することができる。

【0046】精製は好ましくは4℃で実施され、精製の程度は抗酸化剤の用途に依存する。

【0047】本発明は、また、液体培地に懸濁させた光合成性微生物の培養物から抗酸化剤を生産するための密閉型光バイオリアクターを提供し、前記微生物は微藻類とシアノバクテリアとからなるグループから選ばれ、この光バイオリアクターは以下の構成要素からなる：

- (A) 太陽光に対して透明で、その中を液体培地が循環するソーラー・レセプター、
- (B) ソーラー・レセプターの入口に接続され、光合成に必要なCO₂を液体培地に供給する塔型のカーボネーター、
- (C) 光合成により微生物が生成した酸素のコレクター、および、
- (D) 収集された酸素をカーボネーターのところに再注入する手段。

【0048】最大の光合成活動を実現するため、ソーラー・レセプターは液体培地が循環する複数の平行なパイプからなり、端部のコレクターはこれらのパイプを連通する。

【0049】本発明の他の特徴や利点は、添付図面を参照しながら以下の実施例（限定的ではなく、例示を目的とする）の記載を読めばより良く理解されるであろう。

【0050】

【実施例】添付図面を参照して本発明の実施例を説明する。添付図面において：図1は、微藻類の培養物から抗酸化剤を抽出する本発明の方法の種々の工程を示す模式図であり、図2は、微藻類を生産するための“バッチ”方式で作動する本発明の光バイオリアクターの模式図であり、図3は、培地中での光合成活動の一日間の変化を示し、図4は、微藻類を生産するための連続方式で作動する本発明の光バイオリアクターの模式図である。

【0051】図1に示すように、ポルフィリジウム・クルエンタム(Porphyridium cruentum)の培養物1は光バイオリアクター2内で形成され、このリアクターはカリウムと燐と窒素とを富化した合成海水を栄養培地として収容している。カリウムは塩化物の形で、燐はオルト燐酸の形で、窒素は尿素又は硝酸塩の形で存在する。

【0052】培地のpHは微藻類の全生長を通じて6から8に調整され、炭素の供給は二酸化炭素の形で行われる。この光バイオリアクターの具体的な実施態様は図2および図3を参照して後述する。

【0053】微藻類の培養は数日にわたって行われ、培地は1リットル当たり約1グラムの乾燥微藻類を含有する。

【0054】これらの微藻類の生産は自然照明条件下で行われると共に、抗酸化剤を抽出するための微藻類の処

理は12時間から18時間かけて、かつ、微藻類の指数増殖期(exponential growth phase)に行われる。

【0055】光バイオリアクターから取り出した培養物は、微藻類の膜透過性を増加させ、従って、抗酸化剤の細胞外含有率を増加させるため、40℃から50℃に保持した水浴4に10分から20分間入れる。この加熱は攪拌しながら行われる。

【0056】参照番号6で示したように、次に培養物1を200 L/h/m²前後の流量で回転フィルター7で濾過し、培地から微藻類を分離する。この工程は1 m³/hの流量で10,000 gから30,000 gで連続遠心分離機で行なうこともできる。6で得られた澄んだ濾液9はジスムターゼ超酸化酵素の半分以上を含有している。特に、液体培地中で測定（測定はNBTによる）した酵素活性度は10 U/mlから30 U/mlである。

【0057】SODは直接に水に溶けており、次に参照番号8で示したように10,000ダルトンの鉍物膜を用いた限外濾過により濃縮することができる。

【0058】このように濃縮した濾液9は参照番号10で示したように、特に陰イオン交換クロマトグラフィーにより、精製することができる。

【0059】濃縮工程8および精製工程10は約4℃で行われる。

【0060】6で得られた固形物は基本的に微藻類を含有している。微藻類は、13から導入する燐酸塩緩衝溶液(50 mM、pH 7.8)中で、参照番号12で示すように攪拌しながら希釈され、14で模式的に示した“粉碎”工程に最良の微藻類の濃縮液を得る。12で得られた懸濁液15における微藻類の濃度は乾燥物20 g/l〜100 g/lである。

【0061】懸濁液15は、次に、2×10⁷パスカル〜5×10⁷パスカルの圧力で作動するマントン・ゴーリン(Manton-Gaulin)型のATVホモジナイザー内で加圧-減圧サイクルに付される。この工程は好ましくは4℃で実施される。この工程の目的は、微藻類を破裂させ、すべての細胞内容物を溶媒に対してアクセス可能にすることである。

【0062】14で得たポルフィリジウム・クルエンタム(Porphyridium cruentum)の細胞からなる懸濁液に対し、植物油又は鉍物油（例えば、大豆油、又は、アセトン若しくはメタノール系溶媒）を添加することにより、トコフェロールのような脂溶性の抗酸化剤とビタミンCおよびSODのような水溶性の抗酸化剤とを同時に抽出する。

【0063】この溶媒添加は参照番号16で示した。矢印17は細胞懸濁液への溶媒の導入を表す。この溶媒添加は攪拌しながら約4℃で行う。得られた細胞懸濁液を参照番号19で示した。

【0064】参照番号18で示したように、細胞懸濁液19は次にVA35-09-566型ピストン弁を備えた単段遠心

式抽出器で遠心分離する。得られる遠心分離物は、特に、SODとビタミンCとを含有する水溶液と、トコフェロールを含有する油性溶液からなる。参照番号21は水溶液の回収に対応し、参照番号23は油性溶液の回収に対応する。

【0065】これらの溶液は、次に、6で微藻類を分離した後に得られる液体培地と同様に、8で示したように濃縮することができる。

【0066】遠心分離18の結果として25で得られる固体残滓は微藻類の断片を含有している。

【0067】図2には、抗酸化剤を生成する微藻類又はシアノバクテリアを“バッチ”方式で培養するための本発明の光バイオリアクターを示す。

【0068】この密閉型光バイオリアクター2はソーラー・レセプター30を備え、このソーラー・レセプター30はポリエチレンのような透明な可撓性プラスチック材料で形成された平行なパイプ32を有し、微生物とその生長に必要な栄養要素とを含む培地はこれらのパイプ中を循環する。ポリプロピレン製のコレクター34および36はパイプ32を相互に連結すると共に、1つのパイプから他のパイプへと液体が通過するのを可能にするものである。

【0069】このソーラー・レセプター30は温度調節のため所定広さの水面上に配置するようになっている。

【0070】このソーラー・レセプターの構造と作動の詳細については、前述したFR-A-2,621,323を参照することができる。

【0071】1サイクル即ち1“run”の間の培地へのCO₂の供給は、導入導管40を介してソーラー・レセプター30の入口に接続されたカーボネーター38により行われる。導管40には、光バイオリアクター全体に培地を循環させるためのポンプ42が設けてある。

【0072】カーボネーター38は塔型のもので、導管40を通じての培地へのCO₂の供給はカーボネーターの底部から行われる。

【0073】光バイオリアクターは更に微藻類の生長に必要な栄養培地を攪拌状態で調製するための槽44を有する。この栄養培地は、導管40に分岐して設けた導入導管46を介して、サイクルの初期に、微藻類を含む液体培地に導入される。この分岐導管46は栄養培地の注入を制御するための弁47を備えている。

【0074】ソーラー・レセプター30内では、光合成作用により酸素が形成される。ソーラー・レセプター30の出口、より詳しくはコレクター34および36の出口に設けたパージパイプ48は、ソーラー・レセプターのパイプ32内で形成されるガスポケットを除去する。このガスは、ソーラー・レセプター30の強太陽照射条件においては、75容積%までの酸素を含有することがあり、酸素は光合成により発生する。

【0075】この酸素ガスはコレクター50内に収集さ

れ、次いで導管49を介してカーボネーター38内に再注入される。酸素ガスのリサイクルはカーボネーター38の底部に行われる。

【0076】カーボネーター内で酸素は培地中に再溶解する。培地中を酸素が通過するのを容易にするため、カーボネーターの上部には円錐形のデフレクター・プレート（拡散プレート）51が設けてある。

【0077】カーボネーター38内へのCO₂の供給は空気との混合物として行われ、混合物中のCO₂は80容積%までである。このガス状混合物は供給導管53を介して槽52内に導入される。

【0078】この槽の出口には導入導管54が設けてあり、この導管はカーボネーター38の中央浸漬パイプ56に連結してある。このパイプ56はカーボネーターの回転軸線に沿って配置してある。パイプ56の浸漬端部58は孔隙率可変の焼結ガラス又は焼結ステンレスで形成してあり、微藻類を含有する液体培地内にCO₂が対向流方式で容易に溶解するようになっている。カーボネーターへの培地1の導入は、ソーラー・レセプターの下流側コレクター36の出口に設けた導入導管60を介して、カーボネーターの上部に行われる。

【0079】焼結ガラス58によりカーボネーター38内に導入された空気とCO₂との混合物は、培地中に溶解した酸素の脱着を僅かに生じさせる。カーボネーターの頂部に集積したガス状混合物は排出導管62により回収され、槽52内に再び注入される。

【0080】この槽52内のガスはピストン式の装置64により圧縮され、導管54と浸漬パイプ56とを介してカーボネーター38内に再注入される。

【0081】カーボネーターの基部に再注入されるこのガスは、脱着した酸素と、液相中に溶解しなかったCO₂とを含有している。

【0082】槽52には圧力調整器66が設けてあり、その圧力レベルは0.1×10⁵パスカルから0.5×10⁵パスカルに調整してある。

【0083】この装置は培地を溶解酸素で富化することを可能にするものである。

【0084】強太陽照射条件下においては、ガス相内の酸素の割合は、供給導管53の入口において、21容積%である。

【0085】カーボネーター38の出口又はソーラー・レセプター30入口においては、即ち、導管40内においては、ガス状混合物は70容積%の酸素を含有する。これは、カーボネーター内に60を通過して到来する培地は、光合成による溶解酸素に非常に富んでいることに因るものである。

【0086】ソーラー・レセプターの出口においては、即ち、パージパイプ48内においては、ガス状混合物は75容積%の酸素を含有する。従って、培地を閉込めることによりソーラー・レセプター30内で酸素は70容

積%から75容積%富化される。

【0087】カーボネーターのレベルにおける部分的脱酸素又は酸素の脱着は、カーボネーター内のガス相酸素の濃度を75容積%から70容積%低下させる。

【0088】このような酸化性条件下においては、培養した微藻類は抗酸化剤を合成して反応する。

【0089】特に、微藻類ポルフィリジウム・クルエンタム(*Porphyridium cruentum*)は、培養物1ml当り平均 $10 \sim 20$ U(NBT)(即ち、 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ U/m³)のSODと、1kg当り5~7グラムの割合のピタミンCを生成して反応する。他方、微藻類ヘマトコッカス・プルピアリス(*Haematococcus pluvialis*)は微藻類1kg当り4~5グラムの割合のピタミンEと0.5~1グラムの割合のガンマ・トコフェロールを生成しながら反応する。

【0090】図2に示した装置は、更に、出口導管60に設けた分岐導管68を備え、この分岐導管には弁70が設けてある。この導管68は槽72内に開口している。この槽72は、抗酸化剤を抽出するために、培養サイクルの後に微藻類と培地を回収することを目的として

いる。
【0091】抗酸化剤の生産に好ましい条件は、光合成活動度の高い条件である。また、このような条件は、培養サイクル(即ち、“run”ラン)のスケールを10~20日として最適化することができる。微藻類の光合成活動は“ラン”の初期に、即ち、生長の指数増殖期に最大である。このことを以下の例により示す。

【0092】ポルフィリジウム・クルエンタム(*Porphyridium cruentum*)の培養物について行なった“ラン”において、本発明者は以下のSOD濃度を観測した。

【0093】

5日目: 25 U(NBT) / 培地ml (1.0 g MS / 培地1)、即ち、25,000 U / 培地g

10日目: 31 U(NBT) / 培地ml (1.3 g MS / 培地1)、即ち、24,000 U / 培地g

17日目: 27 U(NBT) / 培地ml (1.8 g MS / 培地1)、即ち、15,000 U / 培地g

26日目: 3 U(NBT) / 培地ml (2.0 g MS / 培地1)、即ち、1,500 U / 培地g

(註: 前述した如く、MSは微藻類の乾燥物を表す)

上記例によれば、抗酸化剤の最大の生成はランの1日目から10日目に起こることが明らかである。

【0094】微藻類としてヘマトコッカス・プルピアリス(*Haematococcus pluvialis*)を用いたランにおいても同様の測定を行なった。本発明者は微藻類における以下のトコフェロール濃度を観測した。

【0095】

2日目: 4,500 ppmのアルファ・トコフェロール、660 ppmのガンマ・トコフェロール

20日目: 80 ppmのアルファ・トコフェロール、

130 ppmのガンマ・トコフェロール

本発明に従えば、微生物は自然照明条件下で、即ち、昼夜交替する条件下で、密閉型光バイオリアクター内で培養される。微生物によるCO₂の同化、従って、O₂の生成は光の強度に直接に関連する。従って、それらは昼間に最良となる。

【0096】図3のグラフは、培地に溶解したCO₂および酸素の圧力の一日間の変化を示す。これらのガスの圧力はppmで表してある。カーブAはCO₂の圧力を表し、カーブBはO₂の圧力を表す。カーブCは一日間の太陽エネルギー(ES)を表し、単位はキロジュール/m²/sである。

【0097】これらのカーブから、抗酸化剤の最良の生成条件は12時と18時との間に位置することが明らかである。従って、抗酸化剤の回収はこの期間に行う。

【0098】微藻類の培養、従って抗酸化剤の生成は、また、図4に示した光バイオリアクターを用いて連続的に行うことができる。この光バイオリアクターの構成要素のうち、図2のリアクターの構成要素と同一のものは、同じ参照番号で示してある。

【0099】この光バイオリアクターは、図2の場合と同様に、管状のソーラー・レセプター30を備え、その上流および下流にはコレクター34および36が設けてある。コレクター34の入口と出口を連通する導管40aにはポンプ42aが設けてあり、このポンプは連続的に作動する。このポンプは微藻類を含んだ培地をソーラー・レセプター30内に連続的に循環させる。ソーラー・レセプターと導管40aとポンプ42aとの全体は密閉されたアッセンブリーを形成する。即ち、微生物はこのアッセンブリーから出ることはない。

【0100】槽44内で攪拌しながら調製された栄養培地は、この実施例の場合、導入導管46aを介してカーボネーター38aの頂部に連続的に導入される。導管46aには連続的に作動するポンプ73が設けてあり、栄養培地の流量を調節し、従って、栄養培地の更新の割合(1日1回)を調節できるようになっている。

【0101】浸漬パイプ56の浸漬端部には焼結ガラス58が設けてあり、この浸漬パイプはカーボネーター38a内の栄養培地にCO₂を対向流方式で供給するようになっている。

【0102】浸漬パイプ56の入口に設けたリザーバー74の作用により圧力下で注入されるCO₂ガスを容易に溶解させるため、カーボネーターの塔にはラシッヒリング若しくはパートサポート型のライニング76が設けてある。

【0103】炭酸ガスを吹込まれた栄養培地は、次に、カーボネーター38aの底部をソーラー・レセプター30のコレクター34に接続する導入導管40bにより、ソーラー・レセプター30内に注入される。この導管40bは連続的に作動するポンプ42bを備えており、こ

のポンプの流量はポンプ73および75と同様に調節される。

【0104】ソーラー・レセプター30の出口からは、ポンプ75を備えた導管60aが槽77内へと培地を連続的に搬送する。この槽77は、抗酸化剤を抽出するために、微生物を含んだ培地を回収することを目的としている。

【0105】前述した場合と同様に、ソーラー・レセプター30内では、光合成により培地は溶解酸素で富化される。酸素を含有する形成されたガスポケットはパージパイプ48によりレセプター30から酸素コレクター50に向けて排出される。

【0106】このコレクター50は酸素に富んだパージガスの圧力を測定するための圧力計78を備えている。

【0107】圧力が $0.4 \sim 0.5 \times 10^5$ パスカルになった時には、電磁弁80はコレクター50内に集積したガスを放出する。このガスは、光合成により発生した酸素ガスを培地中に溶解させるべく、導管49によりカーボネーター38aの底部に再注入される。

【0108】ソーラー・レセプター30内に集積したガスは、前述の場合と同様に、溶解酸素を富化させる。

【0109】光バイオリアクターの液体培地中の溶解酸素濃度を増加させるため、リアクタを高压で作動させることが望ましい。図示した実施例では、ソーラー・レセプターのパイプ32は 0.5×10^5 パスカル以上の圧力には耐えない。また、電磁弁80の開放は $0.4 \sim 0.5 \times 10^5$ パスカルで行われる。酸素で富化されたガスの通常の圧力は $0.1 \sim 0.2 \times 10^5$ パスカルである。

【0110】図4のカーボネーター38aとは異なり、図2に示した光バイオリアクターにおいては、カーボネーター38はライニングを備えていない。何故ならば、“バッチ”方式においては、微生物を含んだ液体培地がカーボネーターを通るので、微生物がライニングに付着するからである。カーボネーター38aには、ガスと栄

養培地のみが循環する。

【0111】培地の酸素富化を更に向上させるため、図4の光バイオリアクターの加圧CO₂リザーバー74を、カーボネーター内で脱着する酸素を回収する装置52-54-66(図2)で置換することができる。

【0112】本発明に従って培養し処理したポルフィリジウム・クルエンタム(Porphyridium cruentum)では、1000リットルの培地内で $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ NBT単位のSODを得ることが可能であり、これは培地1m³当たり9~36グラムのSODが生産されることに対応する。このような条件下では、1ヘクタールの水面上に広げたソーラー・レセプター30は、200日/年の稼働により、90~360kgのSODを生産することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、微藻類の培養物から抗酸化剤を抽出する本発明の方法の種々の工程を示す模式図である。

【図2】図2は、微藻類を生産するための“バッチ”方式で作動する本発明の光バイオリアクターの模式図である。

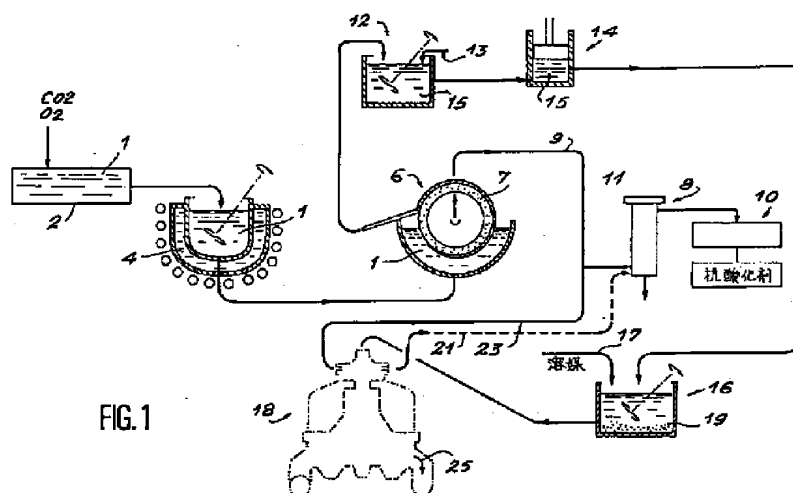
【図3】図3は、培地中での光合成活動の一日間の変化を示すグラフである。

【図4】図4は、微藻類を生産するための連続方式で作動する本発明の光バイオリアクターの模式図である。

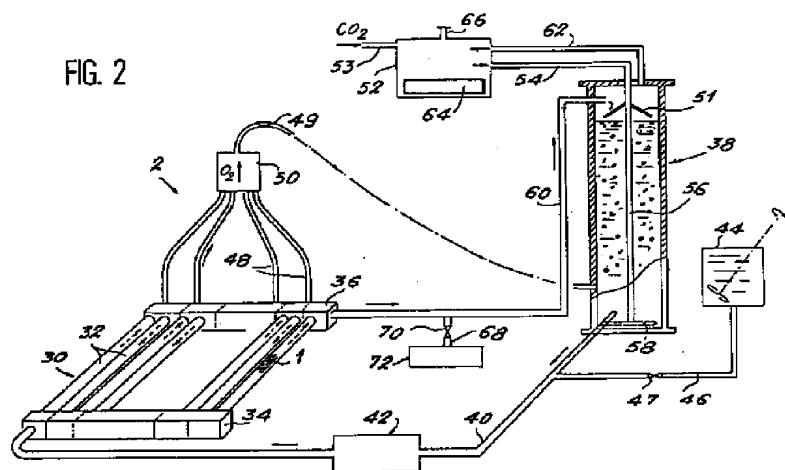
【符号の説明】

- 1: 培地
- 2: 光バイオリアクター
- 4: 水浴
- 7: フィルター
- 8: 濃縮装置
- 10: 精製装置
- 14: 粉碎装置
- 15、19: 懸濁液

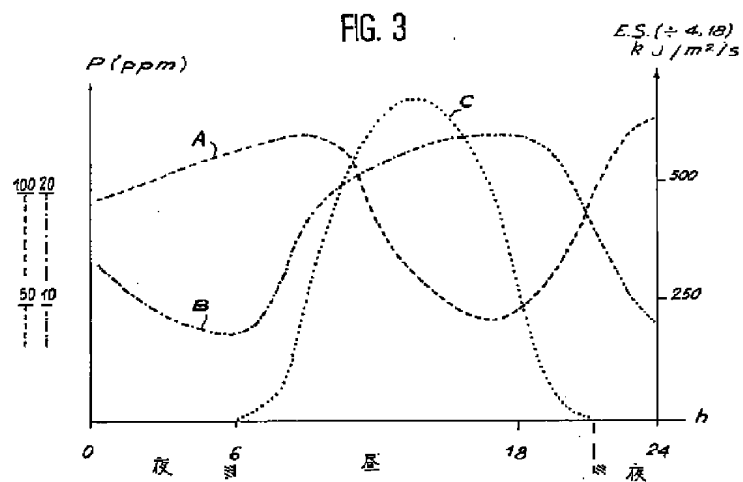
【図1】



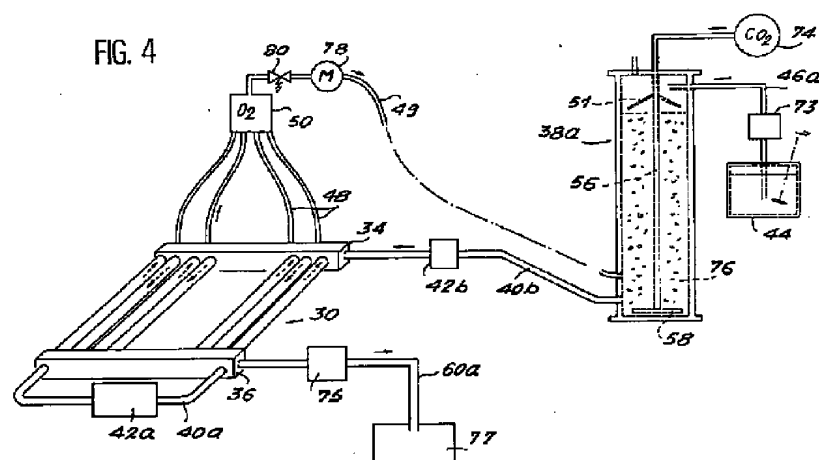
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 17/06

2104-4B

// (C 1 2 N 9/02

C 1 2 R 1:89)

(C 1 2 P 1/00

C 1 2 R 1:89)

(C 1 2 P 17/04

C 1 2 R 1:89)

(C 1 2 P 17/06

C 1 2 R 1:89)

(72)発明者 クロード・ギダン
フランス国、13100・エクスアンプロバン
ス、ル・パルク、トラベルス・サント・ア
ンヌ、4

(72)発明者 カトリーヌ・テベニエ
フランス国、04100・マノスク、レ・レス
タンク・ドウ・ラ・トマズンヌ (番地な
し)